

補助事業番号 2021M-152

補助事業名 2021年度高温によるアミロイド凝集反応のリアルタイム計測機器の開発
補助事業

補助事業者名 大阪大学国際医工情報センター 山口圭一

1 研究の概要

アミロイド線維はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患や透析アミロイドーシスなど様々な疾患の原因になっている。アミロイド病の治療法の開発は世界中で行われているが、早期診断法と組み合わせることが重要である。本補助事業では、アミロイド病の早期診断を目指して、“高温によるアミロイド凝集反応のリアルタイム計測機器”を研究開発した。まず、アルツハイマー病の原因であるタウ蛋白質を用いて、高温加熱によるアミロイド凝集実験を行った。次に、リアルタイムPCRを用いて、高温加熱による多サンプルのアミロイド凝集実験を行った。その結果、リアルタイムPCRを用いて溶液を高温加熱することで、パーキンソン病の原因蛋白質である α シヌクレインと透析アミロイドーシスの原因蛋白質である β 2ミクログロブリンのアミロイド線維形が促進されることが明らかになった。また、反応溶液に血清を添加した結果、ThT蛍光値の上昇が観察された。生体試料によるアミロイド形成反応のシーディング効果については、今後も条件検討が必要である。生体内の極微量の凝集核を検出することが可能になれば、アミロイド病の早期診断につながるかと期待される。

2 研究の目的と背景

日本が将来超高齢化社会を迎えるにあたり、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患や透析アミロイドーシスなどのアミロイド病患者が増えると予想され、治療法の開発が急がれている。しかし、治療法の開発にはアミロイド病の早期診断法が重要になる。アミロイド病では、蛋白質がアミロイド線維と呼ばれる β シート構造に富む凝集体を形成して、脳または全身の臓器に蓄積することによって引き起こされる。蓄積したアミロイド線維は、脳脊髄液や血液中にも極少量流出する。本補助事業では、アミロイド病の早期診断を目指して、リアルタイムPCRを用いて“高温によるアミロイド凝集反応のリアルタイム計測機器”を開発することを目的とする。高温にすることで分子間の疎水的相互作用が強くなり、蛋白質は凝集しやすくなる。本補助事業で開発した機器を用いて、アミロイド形成反応機構を解明すると共に生体試料の多検体アッセイに応用して、種々のアミロイド病の早期診断や治療法の開発につなげる。

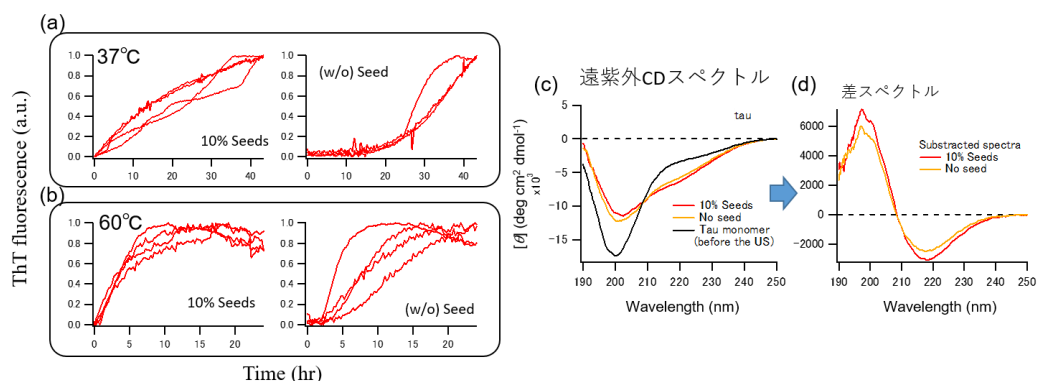
3 研究内容

(1) 高温によるアミロイド凝集反応のリアルタイム計測機器の開発

(URL; <https://supersaturation.sakura.ne.jp/research.html>)

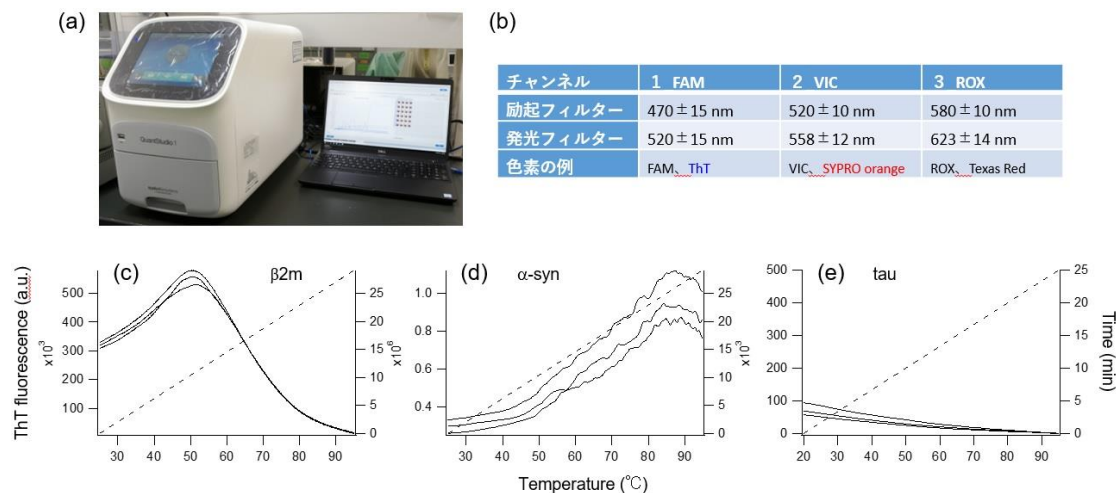
(URL; https://supersaturation.sakura.ne.jp/JKA/2021_project.html)

① 分光蛍光光度計を用いた高温加熱によるアミロイド凝集実験

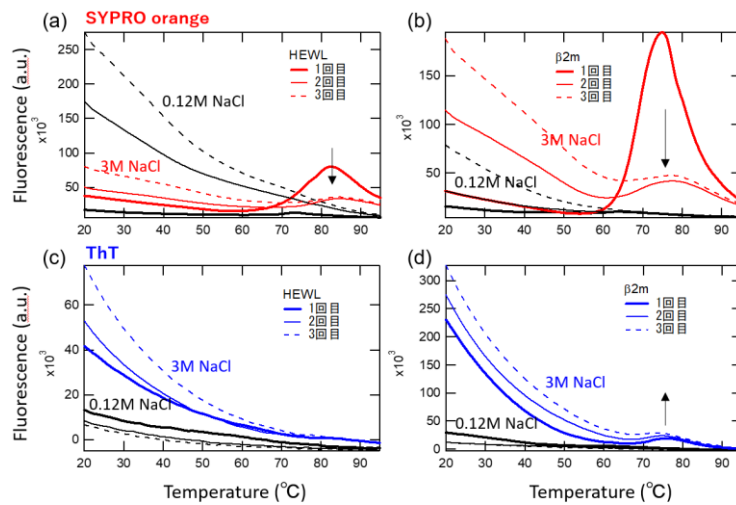


アルツハイマー病の原因蛋白質であるタウ蛋白質を用いて、高温加熱によるアミロイド凝集実験を実施した。超音波照射下で反応温度を37°Cから60°Cにすることで、tauのアミロイド形成反応が促進された(a, b)。また、試験管内で作製したシードを10%加えることで、37°Cと60°C共にアミロイド線維形成が促進された。円二色性(CD)による二次構造解析により、形成されたアミロイド線維はβシート構造に富むことが明らかになった(c, d)。

② リアルタイムPCRを用いた高温加熱による多サンプルのアミロイド凝集実験

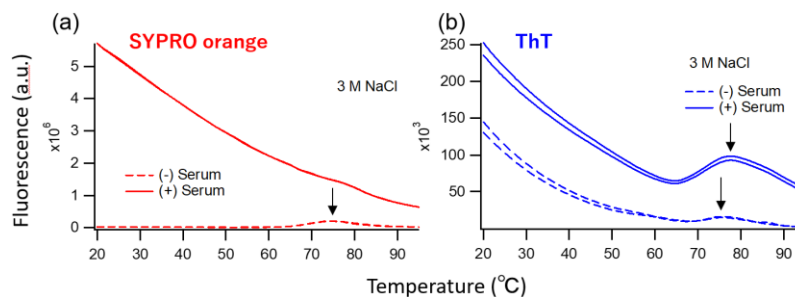


導入したQuantStudio 1リアルタイムPCRシステム(a)と蛍光チャンネル(b)。(c-e)リアルタイムPCRを用いて、溶液温度を25°Cから95°Cまで徐々に変化させてアミロイド形成実験を行った。透析アミロイド病の原因蛋白質であるβ2ミクログロブリン(β2m)(c)、パーキンソン病の原因蛋白質であるαシヌクレイン(α-syn)(d)とタウ蛋白質(tau)(e)のアミロイド線維形成。tauはアミロイドを形成しておらず、条件検討が必要である。



β 2mと卵白リゾチーム (HEWL) のSYPRO orange (a, c)とチオフラビンT (ThT) (b, d) 蛍光測定。ThTとSYPRO orange蛍光を組み合わせることで、蛋白質のアミロイド線維形成と同時に変性反応が測定可能である。昇温を3回繰り返すと、HEWLと β 2mともに3M NaCl存在下で、SYPRO orange蛍光の減少が観察されたが、 β 2mのThT蛍光強度は増加した。 β 2mは高温で変性してアミロイド線維を形成すると考えられる。

③ アミロイド凝集実験の生体試料への応用



血清を2%添加した高温加熱による β 2mのアミロイド形成実験。SYPRO orange蛍光より、血清非存在下では74.9°Cで天然構造の変性が観察されたが、血清存在下では全体的な蛍光値の上昇のみ観察された(a)。一方、ThT蛍光は、血清存在下で77.4°Cで顕著な蛍光強度の増加が観察された(b)。生体試料中においてアミロイド形成の促進因子が示唆された。

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

現在、アルツハイマー病やパーキンソン病など、25種類以上のアミロイド病が知られており、それぞれの疾患の原因蛋白質についてこの手法は適応可能である。日本が将来超高齢化社会になるにつれ、アルツハイマー病やパーキンソン病の患者数は増加すると考えられる。本補助事業で研究開発したリアルタイムPCRを用いて溶液温度の昇降を繰り返すことで、アミロイド線維のリアルタイム計測が可能である。今後、高温によるアミロイド凝集反応の

条件最適化、さらに凝集反応を均一にすることで、生体内の極微量の凝集核を検出することが可能になれば、アミロイド病の早期診断につながると期待される。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

アミロイド病の治療法の開発は世界中で行われているが、病気が進行してから治療することは非常に困難である。そのためアミロイド病の治療には、早期診断あるいは発症前診断が必要になる。早期診断法には、超音波を用いたPMCA法やHANABI、かく拌を用いたRT-QuIC法などによる凝集核の増幅法がある。本補助事業では、リアルタイムPCRを用いて溶液の温度を急激に上昇させ、分子間の疎水的相互作用を強めることで、アミロイド凝集反応を促進させる。さらに自由な温度設定と多サンプルのアッセイが可能であり、早期診断機器としてだけでなく、アミロイド研究にも役立つと考えられる。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

【学会発表】

○山口圭一, 澤田真弥, 中島吉太郎, 宗正智, 荻博次, 河田康志, 後藤祐児. 超音波照射下における α シヌクレインのATP依存的アミロイド形成. 第21回 日本蛋白質科学会年会. 2021年6月18日. ポスター発表.

○山口圭一, 澤田真弥, 中島吉太郎, 後藤祐児. 超音波照射下におけるATP依存的な α シヌクレインのアミロイド線維形成. 第8回 日本アミロイドーシス学会学術集会. 2021年11月19日. ポスター発表.

7 補助事業に係る成果物

(1)補助事業により作成したもの

該当なし。

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

該当なし。

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名: 大阪大学 国際医工情報センター

(オオサカダイガク コクサイイコウジョウホウセンター)

住 所: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2

担 当 者: 役職名 寄附研究部門助教 (キフケンキュウブモンジョキョウ)

担 当 部 署: 蛋白質凝集制御デバイス寄附研究部門

(タンパクシツギョウシュウセイギョデバイスキフケンキュウブモン)

E - m a i l: kyamaguchi@mei.osaka-u.ac.jp

U R L: <https://supersaturation.sakura.ne.jp>